Münster 1936 No 274 Med DISS

Aus der Med. Poliklinik der Medizinischen Akademie Düsseldorf
Direktor Professor Dr. H. W. Knipping

Beitrag zum Nachweis der Brenztraubensäure im Blut.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Würde eines doctor medicinae
durch die Medizinische Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
in Gemeinschaft mit
der Medizinischen Akademie in Düsseldorf

vorgelegt von
GERHARD MATTHIESSEN
aus Hamburg

1936

DISSERTATIONS-VERLAG G. H. NOLTE DÜSSELDORF

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Akademie in Düsseldorf und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster.

gez.: Manteufel
Rektor der Medizinischen Akademie Düsseldorf

gez.: Klinge
Dekan der Medizinischen Fakultät Münster

gez.: Knipping
1. Berichterstatter

gez.: Schilling
2. Berichterstatter

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I. Kurze und allgemeine Betrachtung der Zusammenhänge zwischen intermediärem Stoffwechsel und Sauerstoffdruck.

Bei allen Krankheiten, die mit schwerer und langdauernder Anoxaemie einhergehen, sind die Störungen, die alle Organe in ihren Funktionen in Mitleidenschaft ziehen, sehr beträchtlich. Es liegt absolut im Bereiche der Möglichkeit, daß diese Störungen, die sich klinisch sehr eindrucksvoll demonstrieren, hervorgerufen werden durch Veränderung des intermediären Stoffwechsels bei herabgesetztem Sauerstoffdruck. In erster Linie kommt dabei wohl als wichtigster Stoffwechselvorgang der Kohlehydratabbau in Betracht. Es hat den Anschein, daß bei normalem Zuckerzerfall ein anoxibiontischer Abbau auf die C_3-Stufe vorausgeht, der bei Prozessen, die mit schwerer Anoxaemie einhergehen, eventuell stärker in Erscheinung tritt.

Die Milchsäure, der Glyzerinaldehyd, das Methylglyoxal und die Brenztraubensäure kommen hierbei als Zwischenprodukt in Frage. Die Milchsäure ist in größeren Mengen bei normalem Stoffwechsel vorhanden als die übrigen vorgenannten Verbindungen, deren Vorkommen überraschend geringfügig ist, obgleich innerhalb von 24 Stunden über 500 g Kohlehydrate abgebaut werden. Als Ursache hierfür kommen vielleicht im Gegensatz zur relativen Indifferenz der Milchsäure die große Labilität und starke Reaktionsfähigkeit der Körper in Frage, sodaß sie entweder schnell abgebaut oder aber von Aminen, Amoniak und Aminosäuren abgebunden werden. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Brenztraubensäure für den Aminosäurenaufbau und ferner die Bildung des Homoallantoins aus Harnstoff und Brenztraubensäure.

Bernhauer weist in einer Arbeit (Chemie und Biochemie der Zuckerarten, Berlin 1933) auf die Beziehungen der Produkte des Zuckerabbaues zu Substanzen wie Kreatinin, Imidazol- und Pyrazolderivate und Nucleine hin, die selbstverständlich mit berücksichtigt werden müssen.

Es ist also möglich, daß geringe Mengen freier Carbonyle und eventuell Carbonylverbindungen im Blute nachzuweisen sind.

II. Einfluß der Verdünnung auf die Darstellung des Brenztraubensäurehydrazons.

Diese Arbeit wird sich darauf beschränken, Eigenschaften der Brenztraubensäure im Reagenzglasversuch festzulegen und Versuche ihres Nachweises im Blut wiederzugeben.

Die Ursache, die Brenztraubensäure als Untersuchungsobjekt zu wählen, liegt erstens in ihrer wenn auch umstrittenen Wichtigkeit für den Kohlehydrateabbau und damit ihres Vorkommens überhaupt, zweitens in der Eigenschaft ihres Hydrazons, sich in Sodalösung quantitativ zu lösen, sodaß eine weitgehende Isolierung ermöglicht wird. Bei den zu erwartenden geringen Mengen Brenztraubensäure mußte darauf geachtet werden, daß einerseits eine in Wasser fast unlösliche und andererseits eine möglichst großmolekulare Verbindung geschaffen wurde.

Aus diesen Gründen lag die Hydrazonbildung sehr nahe. Gewählt wurde das 2—4 Dinitrophenylhydrazin, das auch schon von Purgotti, Neuberg u. a. angewandt wurde. Da das Hydrazin in Wasser fast unlöslich ist, wurde Salzsäure als Lösungsmittel benutzt und zwar gelang es nach mehreren Versuchen, das Hydrazin in der Konzentration 1 g auf 480 ccm 3 n HCl in Lösung zu halten. Das geschieht am besten durch Kochen, es gelingt aber auch durch vielstündiges Schütteln. Werden geringere HCl-Konzentrationen bzw. stärkere Hydrazinkonzentrationen angewandt, so fällt nach 1 bis 4 Tagen eine mehr oder minder erhebliche Menge Hydrazin aus, sodaß die Zusammensetzung der Lösungen verändert wird. Bei einer Vorratslösung mit der oben angegebenen Konzentration zeigten sich die ersten Spuren einer Auskristallisation nach drei Wochen. Das Ergebnis konnte aber noch verbessert werden, indem die Lösung im Eisschrank aufbewahrt wurde, wodurch die Zeit bis zur Auskristallisation auf 5—6 Wochen verlängert werden konnte.

Um eine Orientierung darüber zu bekommen, wie hoch die Ausbeute an Brenztraubensäure bei verschiedenen Verdünnungsgraden ausfällt, wurden Serienversuche mit verschiedenen Verbindungen angestellt. Der Versuchsgang war anfangs wie folgt:

1 ccm n/10 Brenztraubensäure wird mit verschiedenen Mengen H_2O und 37 %iger HCl und darauf mit einer bestimmten Anzahl ccm Hydrazinlösung versetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde durch einen Schottschen Glasfiltertiegel Nr. 11 G 4 abgenutscht. Das Hydrazon wurde in einigen ccm angewärmten Nitrobenzol aufgenommen und letzteres in einem 100 ccm fassenden Vakuumkölbchen unter Vakuum im Ölbad bei 200° abgedampft und das Kölbchen mit Rückstand gewogen.

Nun zeigten sich bei dieser Versuchsanordnung erhebliche Mängel, auf die kurz eingegangen werden soll. Trotzdem die n/10 Brenztraubensäure, aus einer konzentrierten Brenztraubensäure der Firma Merck gewonnen, über n/10 Oxalsäure azidimetrisch eingestellt war, gelang es nie, bei der möglichst geringen Verdünnung 1 ccm n/10 Brenztraubensäure + 10 ccm Hydrazinlösung eine 100%ige Ausbeute zu erreichen, sondern es waren immer Verluste bis zu 40 % zu vermerken. Die Ursachen dafür lagen erstens darin, daß bei der Titration der Brenztraubensäure deren saures Kondensationsprodukt α — Keto γ valero-lacton-γ — carbonsäure miterfaßt wurde und zweitens, daß bei der Vakuumabdampfung des Nitrobenzols eine erhebliche Menge

Hydrazon mitgerissen wurde. Außerdem hatte das Nitrobenzol den Nachteil, daß es trotz viermaliger Destillation nicht rückstandslos gewonnen werden konnte, sodaß der effektive Verlust an Brenztraubensäure mit 40 % zu niedrig beziffert sein dürfte. Die konzentrierte Brenztraubensäure wurde daraufhin einer Destillation bei 60,5° Cels. und einem Vakuum von 11 m Druck unterworfen, das Nitrobenzol wurde zugunsten des Essigesters, der sich bedeutend leichter rückstandsfrei machen läßt, aufgegeben.

Nach diesen Verbesserungen wurden mit obiger Anordnung 100%ige Resultate erzielt, nachdem lange Zeit die Hydrazinmengen variiert werden mußten. 1 mg Brenztraubensäure bildet mit 2—4 Dinitrophenylhydrazin 3,04 mg Hydrazon. In 1 ccm der daraus angefertigten Reagenzlösung (s. oben) sind ca. 2,08 mg Hydrazin enthalten, es werden also für 1 ccm n/10 = 8,8 mg Brenztraubensäure mindestens 8,6 bis 10 ccm Reagenz benötigt. Als geeignetste Menge haben sich 10 ccm Reagenz, also ein gewisser Überschuß, auf 1 ccm n/10 Brenztraubensäure bei 24 stündiger Reaktionsdauer bewährt.

Bei einer Reihe von Untersuchungen, die sich mit der Frage der geeignetsten Reagenzmenge befaßten, ergab sich, daß schon Verluste eintraten, wenn die Anzahl der ccm wenig mehr als 10 ccm betrug, und daß die Verluste sich bis zu 25 % steigerten, wenn 26 ccm angewandt wurden.

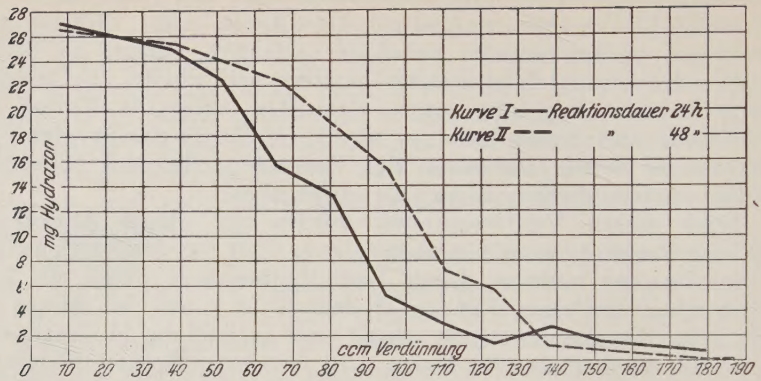
Etwas anders lagen die Dinge bei Verwendung von n-Brenztraubensäure. Hier genügten einerseits 90 ccm Reagenz, andererseits gelangte das Hydrazon auch noch bei einer Menge von 130 ccm Reagenz zur quantitativen Ausfällung.

Mit der nunmehr gereinigten Brenztraubensäure wurden die Versuchsreihen fortgesetzt und es ließ sich bei gleichbleibender Versuchstechnik eine gute Übersicht über die Ausbeutemöglichkeit bei verschiedenen Verdünnungsgraden gewinnen.

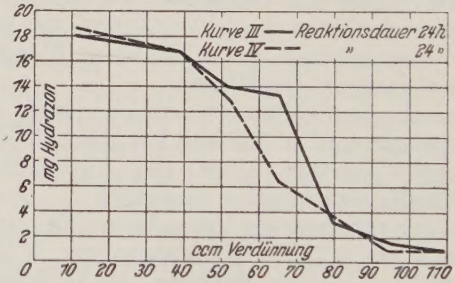
Als Beispiel der verbesserten Versuchsanordnung möge folgender Versuch dienen: 1ccm n/10 Brenztraubensäure + 19 ccm H_2O + 8,26 ccm 37 % HCl + 10 ccm Reagenz (die 37 %ige HCl dient zur Herstellung der dreifach normalen Konzentration, damit kein Hydrazin ausfällt). Nach 24 Stunden Abnutschen, Waschen des Filterinhaltes mit 3 n HCl und H_2O, Aufnehmen desselben in heißem Essigester, Verdampfen und Wägung des Rückstandes. Die bisher geübte Vakuumverdampfung des Essigesters wurde zurückgestellt, da er unter Vakuum unangenehmen Siedeverzug zeigte.

Für die Beeinflussung der Ausbeute durch die verschiedenen Verdünnungen gibt die Kurve I eine gute Übersicht.

Es zeigt sich, daß bei einer Verdünnung von 179,56 ccm die Ausbeute schon auf 0,6 mg gesunken ist; bei weiteren Verdünnungen ist sie = 0. Als Ursache hierfür ist natürlich die verminderte Reaktionsgeschwindigkeit verantwortlich zu machen, denn, wie Kurve II zeigt, steigern sich die Ausbeuten, wenn die Reaktionszeit auf 48 Stunden verlängert wird und, wie Versuch 228 dartut, der bei einer Verdünnung von 110 ccm 168 Stunden Reaktionsdauer hatte, läßt sich die



Ausbeute auf 65 % gegenüber ca. 10,5 % bei einer Reaktionszeit von 24 Stunden ganz erheblich vergrößern. Ein anderer Faktor, der zur Verminderung der Ausbeute beitrug, ist die nicht unbeträchtliche Löslichkeit des Brenztraubensäurehydrazons in 3 n HCl. Bei zweistündigem Schütteln auf der Schüttelmaschine gingen 7 mg Brenz-



traubensäurehydrazon in 100 cm 3 n HCl in Lösung. Eine Zerstörung der Brenztraubensäure durch HCl findet hingegen nicht statt, denn in Versuchen, bei denen Brenztraubensäure mit 37 %iger HCl versetzt wurde, und die eine bis mehrere Stunden vor dem Zusatz des Reagenz standen, ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in der Ausbeute.

In den Kurven III und IV kommen die Ausbeuteverhältnisse bei Verwendung einer ungereinigten Brenztraubensäure für verschiedene Verdünnungsgrade zum Ausdruck.

III. Anreicherung der Brenztraubensäure aus salzsauren Lösungen durch Ausschütteln mit Äther.

Aus den Erfahrungen, die mit den obigen Versuchen gemacht worden sind, geht hervor, daß bei den zu erwartenden geringfügigen Mengen Brenztraubensäure nur wenig oder auch gar nichts aus dem Blut herauszuziehen ist, falls eine Technik in dieser Weise angewandt würde. Deshalb lag es nahe, eine Versuchsanordnung herauszubilden, deren Ziel das Vermeiden der Gefahr einer Verdünnung und die Anreicherung der Brenztraubensäure ist.

Oppenheimer (Handb. d. Biochem.) gibt an, daß die Brenztraubensäure leicht löslich in Äther und daß sie unschwer mit Äther aus wässerigen salzsauren Lösungen extrahierbar sei. Aus diesen Gründen erschien eine Anreicherung der Brenztraubensäure durch Äther das Mittel der Wahl. Inwieweit sich die Angaben Oppenheimers bestätigen, wird sich weiter unten ergeben.

Es wurde nun so vorgegangen, daß 100 ccm 3 n HCl, in der 1 ccm n-Brenztraubensäure gelöst war, mit 100 ccm Äther im Scheidetrichter auf der Schüttelmaschine 5 Stunden lang geschüttelt wurden. Nach Abtrennung der Salzsäure wurde der Äther über 20 ccm 3 n HCl abgedampft, worauf die Salzsäure mit 90 ccm der schon oben erwähnten Reagenzlösung aus 2—4 Dinitrophenylhydrazin versetzt und nach 24 Stunden wie üblich weiterbehandelt wurde. Die abgetrennte Salzsäure, in der ursprünglich die Brenztraubensäure gelöst war, wurde ebenfalls mit 90 ccm Hydrazin versetzt und nach 24 Stunden weiterbehandelt. Aus den Wägungen ließ sich ersehen, daß das Verteilungsverhältnis doch recht ungünstig für den Äther war. Durchschnittlich gingen 20 % der Brenztraubensäure in den Äther, während, wie sich aus der Addition der Hydrazonmengen aus den beiden Ansätzen ergab, eine durchschnittliche Verlustquote von 9 % errechnet werden konnte.

Als Beispiel für eine solche Untersuchung mag Versuch 275 gelten:

1 ccm n-Brenztraubensäure + 100 ccm 3 n HCl + 100 ccm Äther werden 5 Stunden geschüttelt und nach der eben angegebenen Methode bearbeitet. Die mengenmäßige Verteilung berechnet sich wie folgt:

Menge Hydrazon in 3 n HCl = 190 mg, Menge Hydrazon in Äther = 53,4 mg, %-Menge $CH_3COCOOH$ in Äther = 20%, Totalverlust an $CH_3COCOOH$ = 8,9%.

Nachdem durch mehrere Serienversuche festgelegt worden war, daß das Verteilungsverhältnis von Brenztraubensäure zwischen Äther und 3 n HCl immer 1 : 4 blieb, wurde dazu übergegangen, die Schüttelzeiten zu variieren. Das Nächstliegende war, die Schüttelzeiten zu verlängern, um eine größere Ausbeute zu erlangen. Es erwies sich aber, daß bei zehnstündigem Schütteln nur noch Ausbeuten von ca. 11—14% und Verluste bis zu 20% zu verzeichnen waren. Es wurde nun versucht, die Schüttelzeit herabzudrücken. Tatsächlich gelang es

auch bei 5 Min. Schüttelzeit 20% Ausbeute zu bekommen. Unter 5 Min. traten Verluste auf, weshalb bei allen folgenden Versuchen 6 Minuten zum Schütteln gebraucht wurden. Eine Erhöhung der Salzsäurekonzentration auf vierfach normal brachte keine vermehrte Ausbeute. Die Verwendung von 3 n H_2SO_4 brachte zwar eine Verringerung des Verlustes auf 7,5%, aber ebenso eine Ausbeuteverringerung um 3%. Es wurden nun einige Versuche mit Essigester angestellt, ob sich wesentlich bessere Resultate erzielen ließen. Die Steigerung der Ausbeute um ca. 4% rechtfertigte jedoch nicht die Verwendung desselben, da der Essigester den Nachteil hat, erstens teuer zu sein, zweitens einen bedeutend höheren Siedepunkt als Äther zu haben, sodaß bei späterer Extraktion von Blut eventuell tiefer siedende Carbonyle beim Verdampfen zu Verlust gehen.

Man konnte nun, um die Resultate zu steigern, größere Äthermengen verwenden. Versuche, die mit der doppelten Menge Äther angestellt wurden, ergaben gleichbleibende Werte von 31% Ausbeute und ca. 13% Verlust, während die vierfache Menge mit 40—43% relativ noch weniger Ausbeute aufwies. Da auch dieser Weg wenig Erfolg versprach, wurde dazu übergegangen, die Brenztraubensäure mit mehreren gleichen Ätherportionen aus der salzsauren Lösung zu extrahieren. Es konnte aus der Tatsache, daß der Verteilungskoeffizient bekannt war, errechnet werden, daß durch zehnmaliges Ausschütteln mit je zehn gleichen Mengen Äther 89,3% Brenztraubensäure aus ihrer Lösung herauszuziehen sei.

Bevor auf die folgenden Versuche näher eingegangen werden soll, muß an dieser Stelle noch ein Wort über den Äther eingeflochten werden. Am Anfang der Ätherextraktionsversuche wurde bemerkt, daß das Hydrazon der Brenztraubensäure, welches aus der Ätherphase stammte, einen rötlichen Schimmer hatte. Es stellte sich heraus, daß dieser rötliche Ton durch ein Hydrazon hervorgerufen wurde, das auf der Filternutsche liegen blieb, wenn das Brenztraubensäurehydrazon mit Soda herausgelöst wurde. Bei einer Probeverdampfung von 1000 ccm Äther über 3 n HCl mit darauffolgendem Reagenzzusatz, zeigte sich, daß sowohl im Äther D.A.B. als auch im chemisch reinen Äther eine erhebliche Menge Carbonyle enthalten waren; wahrscheinlich Azeton, da dessen Siedepunkt über dem des Äthers liegt. Diese Tatsache gab Veranlassung, eine umfangreiche Ätherreinigung ins Werk zu setzen. Der Reinigungsprozeß sollte, wie gesagt, hauptsächlich den im Äther befindlichen Carbonylen gelten, wurde jedoch auch ausgedehnt auf die durch längere Berührung mit Luft entstehenden Peroxyde. Am vorteilhaftesten erwies sich folgendes Vorgehen: Der Äther wird energisch mit 30%iger Kalilauge geschüttelt, abgetrennt, worauf er mit Fraktionieraufsatz destilliert wird. Der Vor- und der Rücklauf, je 100 ccm auf 1000 ccm, werden verworfen. Der vorgereinigte Äther wird dann mit Hydrazin versetzt und nach 24 Stunden über $CaCl_2$ destilliert und über Na_2SO_4 aufgefangen. In 1000 ccm Äther dürfen nach Verdampfen keine Carbonyle mehr nachweisbar sein.

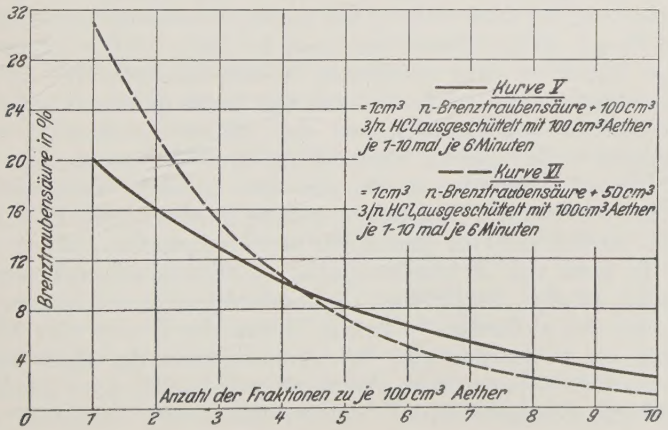
Wie oben schon gesagt, ließe sich theoretisch eine erhebliche Anreicherung erzielen, wenn das fraktionierte Ausschütteln angewandt würde. Versuche, die in dieser Richtung liefen, bestätigten dann die errechneten Ergebnisse. Es wurde angefangen mit fünffachem Extrahieren, da die technischen Schwierigkeiten anfangs recht erheblich waren. Als Beispiel der Versuch 318 : 2 ccm n-Brenztraubensäure, gelöst in 100 ccm 3 n HCl, werden fünfmal mit je 100 ccm Äther je 6 Minuten ausgeschüttelt. Der Äther wird im Scheidetrichter gesammelt und sorgfältig von Salzsäureresten abgetrennt und darauf über 20 ccm 3 n HCl abdestilliert. Die zurückbleibenden 20 ccm HCl werden mit 150 ccm Reagenzlösung versetzt, ebenfalls die extrahierten 100 ccm 3 n HCl. Nach 24 Stunden wird dann die übliche Weiterbehandlung in die Wege geleitet.

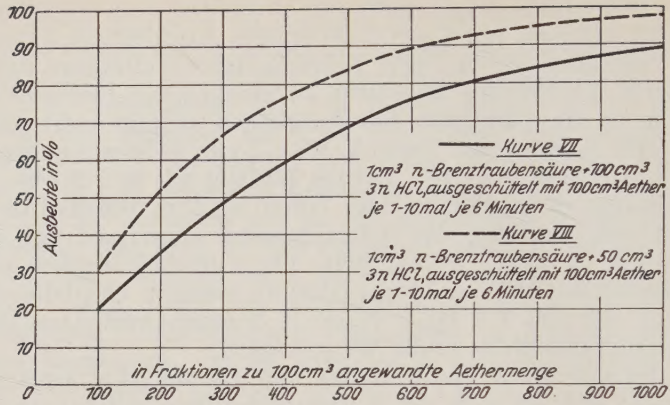
In der salzsauren Phase fanden sich 132 mg Hydrazon, in der Ätherphase 363 mg, d. h. die Ausbeute beziffert sich auf rund 68% gegenüber 68,2% der errechneten. Der Verlust, der durch die ganze Behandlung hervorgerufen wurde, belief sich auf 7%.

Nachdem eine Reihe derselben Versuche das gleiche Resultat ergaben, wurde in der Anzahl der Fraktionen weitergegangen und zehnmal mit Äther ausgeschüttelt. Auch hier bestätigten wieder die Versuche die Errechnung der Ausbeute.

Versuch 330 diene als Beispiel: Es waren dieselben Bedingungen wie bei Versuch 318, nur wurde in diesem Falle zehnmal ausgeschüttelt. Die Ausbeute berechnete sich bei 476 mg Hydrazon aus der Ätherphase auf 89%. 7,3% Totalverlust waren zu verzeichnen.

Viel bequemer schien es, bei den einzelnen Fraktionen die doppelte Äthermenge zu nehmen. Die Ausbeute beträgt, wie bekannt, bei einmaligem Schütteln 31%. Sollte auch hier die Berechnung stimmen, so müßten sich bei 10 Fraktionen 97,8%, resp. bei 6 Fraktionen 89,4% aus der salzsauren Lösung extrahieren lassen. Versuche, die in dieser Richtung hin gemacht wurden, ergaben die Berechtigung, eine derartige Technik anzuwenden.





Die Kurven V und VI geben ein Bild von der prozentualen Beteiligung der einzelnen Fraktionen bei zehnmaligem Ausschütteln mit der einfachen und doppelten Menge Aether. Die Kurven VII und VIII zeigen die Zunahme der Ausbeute bei Schütteln mit einfacher und doppelter Menge Aether.

IV. Anreicherung der Carbonylsäuren im Blut. Versuch des Nachweises der Brenztraubensäure.

Nach dem oben erwähnten Prinzip der Anreicherung mit Äther wurde nun daran gegangen, die im Blut, wie angenommen, vorkommende Brenztraubensäure mit Äther zu extrahieren. Da wegen der verschiedenen Schwierigkeiten eine direkte Ausschüttelung des Blutes nicht in Betracht kam, spielte die zweckmäßigste Enteiweißung eine entscheidende Rolle. Die Methode der Enteiweißung mit Trichloressigsäure, wie sie Neuberg bei seinen Versuchen benutzte, kam nicht in Frage, da die Säure einerseits in Äther löslich ist, andererseits das Filtrat zu sehr verdünnen würde, wodurch eine zu große Menge zu extrahieren wäre, was sich nur unter gewissen technischen Schwierigkeiten, wie Dimensionen der Schüttelmaschine u. a., bewerkstelligen ließe. Da die Vermeidung der Verdünnung ein erhebliches Moment darstellte, so wurden die üblichen Enteiweißungsmethoden, wie die mit Metaphosphorsäure, mit Sublimat, Eisenhydroxyd und Kaolin nicht in den Kreis der Untersuchungen mit einbezogen. Es fand sich im Ammonsulfat ein Enteiweißungsmittel, das durch seine relative Indifferenz als besonders schonend angenommen wurde und das außerdem in keiner Weise die Menge des Filtrates nach oben hin beeinträchtigte. Bei Versuchen, die der Zerstörbarkeit der Brenztraubensäure durch Ammoniumsulfat dienten, wurden bei Verwendung von gesättigter Ammonsulfatlösung (rund 70 g auf

100 ccm H_2O) nur ganz unwesentliche Verluste vermerkt, sodaß seiner Verwendung als Enteiweißungsmittel nichts im Wege stand.

Es wurde nun so vorgegangen, daß 100 ccm Blut mit 70 g Ammonsulfat versetzt wurden. Eine geringere Menge Ammonsulfat würde wohl genügen, aber im Interesse einer absolut vollständigen Enteiweißung wurden 70 g beibehalten. Da, wie oben schon gesagt, die Annahme besteht, daß die Carbonylsäuren an Amine und andere verwandte Körper addiert seien, wurden zu ihrer Abtrennung 20 ccm n-H_2SO_4 auf 100 ccm Blut zugesetzt. Nachdem der Ansatz 10 Minuten gestanden hatte, wurde er durch eine Siebnutsche, die mit zwei Filterblättern Schleicher-Schüll 597 versehen war, abgesogen und mit 20 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung nachgewaschen. Das Filtrat wurde durch Hinzufügen der entsprechenden Menge 37%iger HCl auf die dreifach normale Konzentration gebracht und dann je sechsmal mit doppelter Menge Äther je 6 Min. ausgeschüttelt. Es erwies sich als zweckmäßig, den Äther bei einer Wasserbadtemperatur von 45° C abzudampfen, und zwar über derjenigen Menge 3 n HCl, die dem 20. Teil des Filtrats entspricht. Zur Salzsäure wurde eine bestimmte Anzahl ccm Reagenz zugesetzt und der Ansatz nach 24 Stunden der üblichen Behandlung unterworfen.

Mit dieser Methode wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt, und zwar an Blut von Diabetesfällen, Uraemien, schweren Herzinsuffizienzen und an Blut von Studenten, die am Ergometer von H. W. Knipping eine bestimmte Arbeitsmenge bis zur Erschöpfung leisteten, mit dem Zwecke, eine akute Anoxaemie zu erzeugen, um dadurch den intermediären Stoffwechsel zu beeinflussen.

Es gelang jedoch nur in zwei Fällen, eine etwas schärfere weinrote Färbung des Sodas, mit dem die auf der Nutsche befindlichen Hydrazone gewaschen wurden, zu erhalten. Das Blut der Untersuchung 396 (Arbeitsversuch — 114 ccm) enthielt, kolorimetrisch errechnet, 0,8 mg Brenztraubensäurehydrazon, während der Versuch 413 (Uraemie — 120 ccm) 0,5 mg Brenztraubensäurehydrazon aufwies. Diese sehr geringen Mengen ließen die Vermutung auftauchen, daß das Brenztraubensäurehydrazon sich zum großen Teil in den salzsauren Ansätzen löst, welche Möglichkeiten schon bei den orientierenden Versuchen festgestellt wurden (s. oben S. 9).

Es lag nun nahe, das durchgenutschte Filtrat auszuestern, den dazu benutzten Essigester mit H_2O zu waschen und mit Soda zu extrahieren. Der erste Erfolg war recht ermutigend, doch zeigte sich, daß die intensive Rotfärbung des Sodas von einer Substanz herrührte, die, wie nachgeprüft wurde, sich aus Ammonsulfat und der Reagenzlösung bildete, jedoch keinen Niederschlag ergab. Da diese Methode nicht anzuwenden war, auch Ammonsulfat pr. a. hatte denselben Effekt, so wurde versucht, die Hydrazonbildung sich im Äther vollziehen zu lassen. Eine quantitative Darstellung des Brenztraubensäurehydrazons ließ sich dadurch erreichen, wie sich aus mehreren orientierenden Untersuchungen ergab. Der zur Extraktion benutzte Äther wurde mit einer bestimmten Menge Hydrazin in Substanz

versetzt, nach 24 Stunden mit H_2O gewaschen, auf ein Drittel eingedampft und mit konzentrierter Sodalösung ausgeschüttelt. Auch hier waren die Ergebnisse nicht befriedigend. Nur in einem Falle von Apoplexie (Versuch 421) ließ sich aus 40 ccm Blut kolorimetrisch 0,25 mg Brenztraubensäurehydrazon errechnen.

Die Ätherextraktionsmethoden wurden verlassen zugunsten einer einfacheren, da die Ätherechnik außerdem den Nachteil hatte, daß die Ausbeute in Bezug auf die Gesamthydrazone sehr gering war. Bei der Verdampfungstemperatur von 45° C gehen die tiefersiedenden Carbonyle zu Verlust [1]).

Die jetzt zu beschreibende Technik beruhte auf der hypothetischen Annahme, daß die Carbonyle mehr an Eiweiß, und zwar an das Blutkörpercheneiweiß, gebunden sind. In diesem Falle würde man durch Zentrifugieren des Oxalatblutes den Einfluß der Verdünnung weitgehend ausschalten können. Das Blut wird 15 Minuten zentrifugiert, der Blutkuchen und das Plasma jedes für sich verarbeitet. Auf 100 ccm werden 70 g Ammonsulfat, 70 ccm Ammonsulfatlösung (gesättigt) und 20 ccm n-H_2SO_4 gegeben; nach 10 Minuten wird auf der Filternutsche abgesogen. Das Filtrat wird mit der entsprechenden Menge 37%iger HCl und ein Drittel Reagenz versetzt und nach 24 Stunden abgenutscht und wie üblich weiterbehandelt Tatsächlich war die Ausbeute an Gesamthydrazonen aus dem Blutkuchen um 36% höher als aus dem Plasma, wie aus einem Durchschnitt von 30 Untersuchungen hervorging.

Brenztraubensäure ließ sich nur in äußerst kleinen Mengen nachweisen. Bei den verschiedensten Krankheiten konnte kein quantitativer Unterschied aufgedeckt werden, da die Färbung, die mit wenigen Ausnahmen alle Fälle aufwiesen, sehr geringfügig war. Bei einer Untersuchung von Ochsenblut wurden aus 240 ccm Blutkuchen 40 mg Gesamthydrazone und ca. 3 mg einer Substanz gefunden, die mit Soda die typisch weinrote Farbe des Brenztraubensäurehydrazons zeigte.

Um die Ausbeute bei dieser Technik noch weiter zu steigern, wurde statt der n-H_2SO_4 98%ige Schwefelsäure angewandt. Es ließen sich auch Ausbeuten an Gesamthydrazonen bis auf das Doppelte mehr erzielen, doch blieb die Steigerung in Bezug auf Brenztraubensäure relativ klein. Da es nicht sicher war, ob nicht durch die Schwefelsäure hervorgerufene, oxydative Vorgänge für diese vergrößerte Ausbeute verantwortlich zu machen seien, so wurde davon Abstand genommen, diese Verbesserung weiter auszubauen.

Wurden bei der eben erwähnten Methode die auf der Filternutsche befindlichen Hydrazone mit 10%iger Kalilauge durchgewaschen, nachdem schon Sodalösung durchgeleitet worden war, so trat eine intensiv violette Färbung auf. Durch Ansäuern

1) Für eine spätere Isolierung der Carbonyle wäre das von Vorteil, denn spezifische Lösungsmittel für die bekannten Hydrazone sind, außer für Brenztraubensäurehydrazon, noch nicht gefunden.

mit Salzsäure schlug die Farbe nach gelb um, ohne aber einen Niederschlag zu ergeben. Durch Extrahieren der Lösung mit Essigester und darauffolgendem Abdampfen wurde ein Hydrazon gewonnen, das einen Schmelzpunkt von 255° aufwies. Verfasser glaubt annehmen zu dürfen, daß es durch andere, in KOH lösliche Hydrazone verunreinigtes Methylglyoxalhydrazon ist.

Da auch die letzte Methode keine günstigen Resultate für die Darstellung von Brenztraubensäure ergab, so wurde versucht, das Blut direkt zu extrahieren. Eine Ätherextraktion bot, wie schon angedeutet, viele Schwierigkeiten, besser war die mit Essigester. Sie ermöglichte eine scharfe Abtrennung und ergab kein Schäumen. Vorher wurde festgestellt, daß aus einer wässerigen Lösung die Brenztraubensäure quantitativ herauszuziehen sei, wenn man mit der zehnfachen Menge Essigester extrahierte, der bis zur Sättigung mit Hydrazin (100 mg in 100 ccm Essigester) versetzt war. Ein störendes Moment lag darin, daß der Blutfarbstoff in den Essigester und von da aus in die Sodalösung überging. Das konnte jedoch vermieden werden, indem das Oxalatblut scharf zentrifugiert und nur das Plasma, welches gut abgetrennt und nochmals zentrifugiert war, benutzt wurde. Ging man von 10 ccm Plasma aus, so wurden 100 ccm Essigester, in denen 10 mg Hydrazin gelöst war, gebraucht. Die Versuchsanordnung war im Prinzip wie folgt:

10 ccm Plasma werden mit 2 ccm n-H_2SO_4 versetzt und eine Stunde mit 100 ccm Essigester, in denen 10 mg Dinitrophenylhydrazin enthalten sind, geschüttelt. Der Ester und das Plasma werden zusammen filtriert, darauf abgetrennt, der Ester zweimal mit 10 ccm H_2O gewaschen und dann mit 10 ccm gesättigter Sodalösung ausgeschüttelt. Der Zusatz von n-H_2SO_4 zum Plasma erwies sich auch hier als notwendig, denn Versuche, bei denen mit Zusatz von n/100 Brenztraubensäure zum Plasma ohne Schwefelsäurezusatz gearbeitet wurde, ergaben nur äußerst geringfügige Ausbeuten, während die Ergebnisse bei denselben Versuchen, jedoch mit Schwefelsäurezusatz, bedeutend besser waren.

Bei der Untersuchung von Normalblut entsteht eine Sodafärbung, die ungefähr der Farbe entspricht, welche durch die Lösung von 0,8 ccm der oben erwähnten Reagenzlösung in 10 ccm 3 n HCl hergestellt wird.

Diese Methode ist sehr empfindlich. Setzt man, wie in Versuch 425, 1 ccm n/500 Brenztraubensäure zu 10 ccm Plasma und behandelt dieses wie eben beschrieben, so war noch eine deutliche Färbung des Sodas zu erkennen, die ungleich intensiver war als die von einem normalen Kontrollversuch. Auch die Färbung bei einem Koma diabeticum mit 370 mg/% Blutzucker war bedeutend stärker als die Vergleichsfarbe. Man könnte also diese Methode eventuell zur Kontrolle der diabetischen Azidose verwenden. (Untersuchungen darüber und über andere Krankheiten in der Arbeit von H. W. Knipping, Koch und Matthiessen. Beitr. zur Klin. d. Tbc. von Brauer, Bd. 84, H. 5.)

Außerdem hat sie den Vorteil, daß sie bei etwas größeren Mengen Hydrazon eine Isolierung und Identifizierung zuläßt.

Zusammenfassung.

1. Es werden Zusammenhänge des intermediären Stoffwechsels, insbesondere des Zuckerstoffwechsels mit Veränderungen des Sauerstoffdruckes erörtert.

2. Es wird der Einfluß der Verdünnung auf die Darstellung des Brenztraubensäuredinitrophenylhydrazons kurven- und tabellenmäßig festgelegt.

3. Der Verteilungskoeffizient von Brenztraubensäure zwischen Äther und 3 n HCl wird durch das Verhältnis 1 : 4 ausgedrückt.

4. Es wird eine Methode angegeben, die Brenztraubensäure aus wässerigen salzsauren Lösungen anzureichern.

5. Es wird ein Überblick gegeben über verschiedene Versuche, die einer Darstellung und Isolierung der Brenztraubensäure aus dem Blute durch Anreicherung dienten.

6. Eine größere mengenmäßige Ausbeute an Brenztraubensäure aus Blut wurde mit den angegebenen Methoden nicht erzielt.

Die Vermutung liegt nahe, daß die Brenztraubensäure entweder sehr fest abgebunden oder aber sehr schnell nach ihrem Entstehen, auch bei stärkerem Sauerstoffmangel, weiter abgebaut wird. Es ist jedoch auch möglich, daß die Bedeutung der Brenztraubensäure für den anoxibiontischen Zuckerzerfall nicht sehr erheblich ist, sondern daß sie nur in verschwindend geringen Mengen als Nebenprodukt, bzw. Zwischenprodukt, entsteht.

LEBENSLAUF.

Als Sohn des Gewerbelehrers Theodor Matthiessen am 18. Febr. 1910 zu Hamburg geboren, besuchte ich 4 Jahre die Grundschule, um dann auf die Lichtwarkschule (Deutsche Oberschule) in Hamburg überzugehen. Nach Absolvierung der Reifeprüfung widmete ich mich dem Studium der Medizin. Die vorklinischen Semester verbrachte ich in Hamburg, wo ich die ärztliche Vorprüfung ablegte. Von den klinischen Semestern verbrachte ich das 7. und 8. in Innsbruck, alle anderen in Hamburg.

Im Dezember 1934 bestand ich dort das Staatsexamen und begann am 2. Januar 1935 meine Tätigkeit als Medizinalpraktikant in der ersten medizinischen Universitätsklinik des Universitätskrankenhauses zu Eppendorf, Hamburg; stellvertretender Leiter Dr. Antony.

Am 1. Februar 1935 verließ ich Hamburg, um weiterhin als Medizinalpraktikant an der medizinischen Poliklinik der medizinischen Akademie zu Düsseldorf, Direktor Prof. Dr. H. W. Knipping, beschäftigt zu werden.

Gerhard Matthiessen